Ⅴ．実証試験の方法

1．対象とする化学物質

実証試験において対象とする化学物質は、社会的な重要性・緊急性などのニーズ等を勘案しつつ、本技術による一般環境モニタリングでの利活用を念頭に置きながら、以下に該当する物質の中から選定する。

- ＰＲＴＲ法（特定化学物質の環境への排出量の把握等及び管理の改善の促進に関する法律）対象物質
- 内分泌攪乱作用が疑われる化学物質等

なお、対象とする化学物質の選定にあたっては、機器分析による測定方法があることや複数企業から製品が販売されていること等を優先していくものとする。

2. 実証項目の内容

実証試験は、酵素標識免疫測定法（ＥＬＩＳＡ法）を用いた実証対象製品の基本的な性能と実用的な性能に関する実証項目について検討するものとする。

基本的な性能については、実証対象製品の仕様として環境技術開発者が呈示する事項について信頼ある結果が適切に発揮されるか否かをみる上で重要である。実用的な性能については、環境試料中に様々な夾雑物質が含まれていることを鑑みた上で、実証対象製品が一般環境モニタリングに利活用できるか否かをみる上で重要である。

なお、以下、文中で使用するプレートとはマイクロプレートのことであるが、他形態（チューブ）の製品については読替えて行うものとする。

表 3　実証項目別の視点と方法

項目	指標	視点			方法	
		信頼性	実用性	簡便性	書類	試験
1．基本的な性能						
①測定範囲	相関等	○	○		○	◎（S1）
②検出下限及び定量下限	偏差等	○	○		○	◎（S1）
③繰返し再現性	変動等	○	○		○	◎（S1）
④日間再現性	変動等	○	○		○	◎（S1）
⑤期間再現性	変動等	○	○		○	◎（S1）
⑥プレート間再現性	変動等	○			○	◎（S1）
⑦交差反応性	交差等	○	○		○	◎（S1）
2．実用的な性能						
①回収特性	変動等	○	○		○	◎（S2）
②測定精度等	相関等	○	○	○	○	◎（S3）　＊

注：方法の◎印は考察時により重要となるもの、＊は機器分析も同時に行なうものを示す
S1 及び S2 は分析対象物質又は類似物質の市販標準品で調製した試料、S3 は一般環境中における実際の試料（河川水等）

表 4　実証項目別の内容

項目	内容（概要）
1．基本的な性能	
①測定範囲	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いたELISA測定値の変動等に基づき、数値的な設定の妥当性を検討する。
②検出下限及び定量下限	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて同一条件での同一操作の繰返しによる ELISA 測定値の標準偏差等に基づき、数値的な設定の妥当性を検討する。
③繰返し再現性	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて同一条件での同一操作の繰返しによる ELISA 測定値の変動等に基づき、再現性の妥当性を検討する。
④日間再現性	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて異なる条件（日付）での同一操作による ELISA 測定値の変動等に基づき、再現性の妥当性を検討する。
⑤期間再現性	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて製造後一定期間経過した製品の操作による ELISA 測定値の変動等に基づき、再現性の妥当性を検討する。
⑥プレート間再現性	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて異なるロットや異なるプレート間での ELISA 測定値の変動等に基づき、再現性の妥当性を検討する。
⑦交差反応性	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて類似物質別の ELISA 測定値の相違等に基づき、交差反応性を検討する。
2．実用的な性能	
①回収特性	提出書類の内容、環境試料を模擬し市販標準品で混合調製した試験用試料（濃度既知）を用いた ELISA 測定値の比較等に基づき、回収特性を検討する。
②測定精度等	環境試料（濃度未知）を用いた ELISA 測定値の変動や操作手順・操作方法の特徴等に基づき、測定精度、前処理妥当性、操作簡便性等による環境試料への適用性を検討する。

3．実証試験の内容

実証試験では、基本的及び実用的な性能について検討するものとする。

なお、実証機関は、実証対象製品とともに提出された実証申請書等を参考として具体的な実証試験計画を策定し、技術実証委員会の承認の下で実証試験を実施するものとする。

実証項目別の実証試験の内容は以下に示すとおりである。

(1) 基本的な性能

実証対象製品の基本的な性能を検討するため、製品仕様の信頼性等の観点から標準試料試験を行うものとする。

実証項目別に行う実証試験の内容は、以下に示すとおりである。なお、実証機関は、技術実証委員会の承認の下で、実証項目の補足等による効果的な実証試験を実施することができるものとする。

① 測定範囲

実証対象製品について、分析対象物質の市販標準品の試料（標準試料）を用いて幾つかに調製した濃度（調製濃度）の試験用試料溶液を、同時に同一プレート内で測定を行い、製品の取扱説明書に基づく手法により作成した検量線を用いて試験用試料溶液の濃度（実測濃度）を算出する。

これより、試験用試料溶液の調製濃度と実証対象製品による実測濃度の比較、実測濃度の変動係数等から、測定上の変動等について検討する。

なお、この試験で必要な実証対象製品のキット数は１である。

標準試料試験の手順は、以下のとおりとする。

ｱ．検量線作成用標準溶液の調製

検量線作成用標準溶液の調製は、製品の取扱説明書に基づいた付属品等を用いて行うものとする。例えば、製品に添付された標準品の原液を、取扱説明書で指定された溶液（製品に添付された緩衝液等）で段階的に希釈し、検量線作成のための標準溶液の希釈系列を調製するなどである。

ここで準備する検量線作成用標準溶液の希釈系列は、取扱説明書で指定された数とする。

ｲ．試験用試料溶液の調製

試験用試料溶液の調製は、別途準備した市販標準品の試料（標準試料）を用いて行

うものとする。調製濃度は、製品の測定範囲内で段階的に希釈し設定する。

なお、希釈する溶媒は、取扱説明書で指定された溶液（製品に添付された緩衝液等）を用いるものとする。

ここで準備する試験用試料溶液の種類数は、検量線作成用標準溶液の希釈系列として取扱説明書で指定された数と同数とする。

ｳ．製品の操作

実証対象製品について、検量線作成用標準溶液を用いた測定（取扱説明書で指定された回数）とあわせて、同時に同じプレートで各調製濃度（既知）の試験用試料溶液を用いた測定（３重測定以上）を行うものとする。

なお、製品の操作は、取扱説明書に基づいて行うものとする。

ｴ．吸光度の測定

発色反応後、各試験用試料溶液の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定し、その平均値を各試験用試料溶液の吸光度とする。

ｵ．検量線の作成

製品の取扱説明書に基づき、検量線作成用標準溶液を用いた各濃度での吸光度から検量線を作成する。

なお、検量線の作成にあたって市販解析ソフトを用いた場合は、そのソフト名を明記しておくものとする。

ｶ．実測濃度の算出

製品の取扱説明書に基づき、各試験用試料溶液による吸光度から検量線を用いて各濃度（実測濃度）を算出する。

ｷ．測定範囲の整理

試験用試料溶液について得られた実測濃度を用いて、標準偏差、変動係数（CV、標準偏差／平均×100）等を整理する。

ｸ．考察

得られた変動係数等から、実証対象製品の測定範囲の妥当性について考察する。

② 検出下限及び定量下限

実証対象製品について、分析対象物質の市販標準品の試料（標準試料）を用いて製品の測定範囲下限付近に調製した濃度（調製濃度）の試験用試料溶液を、同時に同一プレート内で繰返し測定を行い、製品の取扱説明書に基づく手法により作成した検量

線を用いて試験用試料溶液の濃度（実測濃度）を算出する。

これより、実証対象製品による実測濃度の標準偏差から、検出下限及び定量下限について検討する。

なお、この試験で必要な実証対象製品のキット数は１である。

標準試料試験の手順は、以下のとおりとする。

ｱ．検量線作成用標準溶液の調製

検量線作成用標準溶液の調製は、製品の取扱説明書に基づいた付属品等を用いて行うものとする。例えば、製品に添付された標準品の原液を、取扱説明書で指定された溶液（製品に添付された緩衝液等）で段階的に希釈し、検量線作成のための標準溶液の希釈系列を調製するなどである。

ここで準備する検量線作成用標準溶液の希釈系列は、取扱説明書で指定された数とする。

ｲ．試験用試料溶液の調製

試験用試料溶液の調製は、別途準備した市販標準品の試料（標準試料）を用いて行うものとする。調製濃度は、製品の測定範囲下限付近に設定する。

なお、希釈する溶媒は、取扱説明書で指定された溶液（製品に添付された緩衝液等）を用いるものとする。

ｳ．製品の操作

実証対象製品について、検量線作成用標準溶液を用いた測定（取扱説明書で指定された回数）とあわせて、同時に同じプレートで同じ調製濃度（既知）の試験用試料溶液を用いた測定（８回以上）を行うものとする。

なお、製品の操作は、取扱説明書に基づいて行うものとする。

ｴ．吸光度の測定

発色反応後、各試験用試料溶液の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定し、その値を各試験用試料溶液の吸光度とする。

ｵ．検量線の作成

製品の取扱説明書に基づき、検量線作成用標準溶液を用いた各濃度での吸光度から検量線を作成する。

なお、検量線の作成にあたって市販解析ソフトを用いた場合は、そのソフト名を明記しておくものとする。

ｶ. 実測濃度の算出

製品の取扱説明書に基づき、各試験用試料溶液による吸光度から検量線を用いて各濃度（実測濃度）を算出する。

ｷ. 検出下限及び定量下限の整理

同じ調製濃度の試験用試料溶液について得られた実測濃度を用いて、標準偏差を整理する。

ｸ. 考察

得られた標準偏差から、実証対象製品の検出下限及び定量下限の妥当性について考察する。

③ 繰返し再現性

実証対象製品について、分析対象物質の市販標準品の試料（標準試料）を用いて幾つかに調製した濃度（調製濃度）の試験用試料溶液を、同一条件下で同時に繰返し測定を行い、製品の取扱説明書に基づく手法により作成した検量線を用いて試験用試料溶液の濃度（実測濃度）を算出する。

これより、試験用試料溶液の調製濃度と実証対象製品による実測濃度の比較、実測濃度の変動係数等から、測定上の変動等について検討する。

なお、この試験で必要な実証対象製品のキット数は１である。

標準試料試験の手順は、以下のとおりとする。

ｱ. 検量線作成用標準溶液の調製

検量線作成用標準溶液の調製は、製品の取扱説明書に基づいた付属品等を用いて行うものとする。例えば、製品に添付された標準品の原液を、取扱説明書で指定された溶液（製品に添付された緩衝液等）で段階的に希釈し、検量線作成のための標準溶液の希釈系列を調製するなどである。

ここで準備する検量線作成用標準溶液の希釈系列は、取扱説明書で指定された数とする。

ｲ. 試験用試料溶液の調製

試験用試料溶液の調製は、別途準備した市販標準品の試料（標準試料）を用いて行うものとする。調製濃度は、製品の測定範囲内の直線域に設定する。

なお、希釈する溶媒は、取扱説明書で指定された溶液（製品に添付された緩衝液等）を用いるものとする。

ｳ. 製品の操作

実証対象製品について、検量線作成用標準溶液を用いた測定（取扱説明書で指定された回数）とあわせて、同時に同じプレートで同じ調製濃度（既知）の試験用試料溶液を用いた測定（３重測定以上、８回以上）を行うものとする。

なお、製品の操作は、取扱説明書に基づいて行うものとする。

ｴ. 吸光度の測定

発色反応後、各試験用試料溶液の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定し、その平均値を各試験用試料溶液の吸光度とする。

ｵ. 検量線の作成

製品の取扱説明書に基づき、検量線作成用標準溶液を用いた各濃度での吸光度から検量線を作成する。

なお、検量線の作成にあたって市販解析ソフトを用いた場合は、そのソフト名を明記しておくものとする。

ｶ. 実測濃度の算出

製品の取扱説明書に基づき、各試験用試料溶液による吸光度から検量線を用いて各濃度（実測濃度）を算出する。

ｷ. 繰返し再現性の整理

同じ調製濃度の試験用試料溶液について得られた実測濃度を用いて、標準偏差、変動係数（CV、標準偏差／平均×100）等を整理する。

ｸ. 考察

得られた変動係数等から、実証対象製品の繰返し再現性の妥当性について考察する。

④ 日間再現性

同じロットで製造された複数（３以上）の実証対象製品について、分析対象物質の市販標準品の試料（標準試料）を用いて幾つかに調製した濃度（調製濃度）の試験用試料溶液を、異なる日時で測定を行い、製品の取扱説明書に基づく手法により作成した検量線を用いて試験用試料溶液の濃度（実測濃度）を算出する。

これより、試験用試料溶液の調製濃度と実証対象製品による実測濃度の比較、実測濃度の変動係数等から、測定上の変動等について検討する。

なお、この試験で必要な実証対象製品のキット数は３以上である。

標準試料試験の手順は、以下のとおりとする。

ｱ．検量線作成用標準溶液の調製

検量線作成用標準溶液の調製は、製品の取扱説明書に基づいた付属品等を用いて行うものとする。例えば、製品に添付された標準品の原液を、取扱説明書で指定された溶液（製品に添付された緩衝液等）で段階的に希釈し、検量線作成のための標準溶液の希釈系列を調製するなどである。

ここで準備する検量線作成用標準溶液の希釈系列は、取扱説明書で指定された数とする。

ｲ．試験用試料溶液の調製

試験用試料溶液の調製は、別途準備した市販標準品の試料（標準試料）を用いて行うものとする。調製濃度は、製品の測定範囲内において段階的に希釈し設定する。

なお、希釈する溶媒は、取扱説明書で指定された溶液（製品に添付された緩衝液等）を用いるものとする。

ここで準備する試験用試料溶液の種類数は、検量線作成用標準溶液の希釈系列として取扱説明書で指定された数と同数とする。

ｳ．製品の操作

実証対象製品について、検量線作成用標準溶液を用いた測定（取扱説明書で指定された回数）とあわせて、異なる日時に異なるプレートで、各調製濃度（既知）の試験用試料溶液を用いた測定（３重測定以上）を行うものとする。

なお、製品の操作は、取扱説明書に基づいて行うものとする。

ｴ．吸光度の測定

発色反応後、各試験用試料溶液の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定し、その平均値を各試験用試料溶液の吸光度とする。

ｵ．検量線の作成

製品の取扱説明書に基づき、検量線作成用標準溶液を用いた各濃度での吸光度から検量線を作成する。

なお、検量線の作成にあたって市販解析ソフトを用いた場合は、そのソフト名を明記しておくものとする。

ｶ．実測濃度の算出

製品の取扱説明書に基づき、各試験用試料溶液による吸光度から検量線を用いて各濃度（実測濃度）を算出する。

ｷ．日間再現性の整理

同じ調製濃度の試験用試料溶液について得られた実測濃度を用いて、標準偏差、変動係数（CV、標準偏差／平均×100）等を整理する。

ｸ．考察

得られた変動係数等から、実証対象製品の日間再現性の妥当性について考察する。

⑤ 期間再現性

製造年月日から数ヶ月経過した実証対象製品について、分析対象物質の市販標準品の試料（標準試料）を用いて幾つかに調製した濃度（調製濃度）の試験用試料溶液を、同時に測定を行い、製品の取扱説明書に基づく手法により作成した検量線を用いて試験用試料溶液の濃度（実測濃度）を算出する。

これより、試験用試料溶液の調製濃度と実証対象製品による実測濃度の比較、実測濃度の変動係数等から、測定上の変動等について検討する。

なお、この試験で必要な実証対象製品のキット数は１である。

標準試料試験の手順は、以下のとおりとする。

ｱ．検量線作成用標準溶液の調製

検量線作成用標準溶液の調製は、製品の取扱説明書に基づいた付属品等を用いて行うものとする。例えば、製品に添付された標準品の原液を、取扱説明書で指定された溶液（製品に添付された緩衝液等）で段階的に希釈し、検量線作成のための標準溶液の希釈系列を調製するなどである。

ここで準備する検量線作成用標準溶液の希釈系列は、取扱説明書で指定された数とする。

ｲ．試験用試料溶液の調製

試験用試料溶液の調製は、別途準備した市販標準品の試料（標準試料）を用いて行うものとする。調製濃度は、製品の測定範囲内で段階的に希釈し設定する。

なお、希釈する溶媒は、取扱説明書で指定された溶液（製品に添付された緩衝液等）を用いるものとする。

ここで準備する試験用試料溶液の種類数は、検量線作成用標準溶液の希釈系列として取扱説明書で指定された数と同数とする。

ｳ．製品の操作

実証対象製品について、検量線作成用標準溶液を用いた測定（取扱説明書で指定された

回数）とあわせて各調製濃度（既知）の試験用試料溶液を用いた測定（３重測定以上）を行うものとする。

なお、製品の操作は、取扱説明書に基づいて行うものとする。

ｴ．吸光度の測定

発色反応後、各試験用試料溶液の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定し、その平均値を各試験用試料溶液の吸光度とする。

ｵ．検量線の作成

製品の取扱説明書に基づき、検量線作成用標準溶液を用いた各濃度での吸光度から検量線を作成する。

なお、検量線の作成にあたって市販解析ソフトを用いた場合は、そのソフト名を明記しておくものとする。

ｶ．実測濃度の算出

製品の取扱説明書に基づき、各試験用試料溶液による吸光度から検量線を用いて各濃度（実測濃度）を算出する。

ｷ．期間再現性の整理

同じ調製濃度の試験用試料溶液について得られた実測濃度を用いて、標準偏差、変動係数（CV、標準偏差／平均×100）等を整理する。

ｸ．考察

得られた変動係数等から、実証対象製品の期間再現性の妥当性について考察する。

⑥ プレート間再現性

同じロット及び異なるロットで製造された複数（３以上）の実証対象製品について、分析対象物質の市販標準品の試料（標準試料）を用いて幾つかに調製した濃度（調製濃度）の試験用試料溶液を、同時に異なるプレート間での繰返し測定を行い、製品の取扱説明書に基づく手法により作成した検量線を用いて試験用試料溶液の濃度（実測濃度）を算出する。

これより、試験用試料溶液の調製濃度と実証対象製品による実測濃度の比較、実測濃度の変動係数等から、測定上の変動等について検討する。

なお、この試験で必要な実証対象製品のキット数は２以上（同じロット）及び１以上（異なるロット）である。

標準試料試験の手順は、以下のとおりとする。

ｱ．検量線作成用標準溶液の調製

検量線作成用標準溶液の調製は、製品の取扱説明書に基づいた付属品等を用いて行うものとする。例えば、製品に添付された標準品の原液を、取扱説明書で指定された溶液（製品に添付された緩衝液等）で段階的に希釈し、検量線作成のための標準溶液の希釈系列を調製するなどである。

ここで準備する検量線作成用標準溶液の希釈系列は、取扱説明書で指定された数とする。

ｲ．試験用試料溶液の調製

試験用試料溶液の調製は、別途準備した市販標準品の試料（標準試料）を用いて行うものとする。調製濃度は、製品の測定範囲内で段階的に希釈し設定する。

なお、希釈する溶媒は、取扱説明書で指定された溶液（製品に添付された緩衝液等）を用いるものとする。

ここで準備する試験用試料溶液の種類数は、検量線作成用標準溶液の希釈系列として取扱説明書で指定された数と同数とする。

ｳ．製品の操作

実証対象製品について、検量線作成用標準溶液を用いた測定（取扱説明書で指定された回数）とあわせて、同時に異なるプレートで各調製濃度（既知）の試験用試料溶液を用いた測定（３重測定以上）を行うものとする。

なお、製品の操作は、取扱説明書に基づいて行うものとする。

ｴ．吸光度の測定

発色反応後、各試験用試料溶液の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定し、その平均値を各試験用試料溶液の吸光度とする。

ｵ．検量線の作成

製品の取扱説明書に基づき、検量線作成用標準溶液を用いた各濃度での吸光度から検量線を作成する。

なお、検量線の作成にあたって市販解析ソフトを用いた場合は、そのソフト名を明記しておくものとする。

ｶ．実測濃度の算出

製品の取扱説明書に基づき、各試験用試料溶液による吸光度から検量線を用いて各濃度（実測濃度）を算出する。

ｷ．プレート間再現性の整理

同じ調製濃度の試験用試料溶液について得られた実測濃度を用いて、標準偏差、変動係数（CV、標準偏差／平均×100）等を整理する。

ｸ．考察

得られた変動係数等から、実証対象製品のプレート間再現性の妥当性について考察する。

⑦ 交差反応性

実証対象製品について、分析対象物質及びその類似物質の市販標準品による試料（標準試料）を用いて調製した試験用試料溶液から濃度反応曲線等を作成する。

これより、物質毎の試験用試料溶液の調製濃度別にみた実証対象製品による 50%阻害濃度等から、分析対象物質を基準とした時の類似物質別の交差率について検討する。

なお、この試験で必要な実証対象製品のキット数は１である。

標準試料試験の手順は、以下のとおりとする。

ｱ．検量線作成用標準溶液の調製

検量線作成用標準溶液の調製は、製品の取扱説明書に基づいた付属品等を用いて行うものとする。例えば、製品に添付された標準品の原液を、取扱説明書で指定された溶液（製品に添付された緩衝液等）で段階的に希釈し、検量線作成のための標準溶液の希釈系列を調製するなどである。

ここで準備する検量線作成用標準溶液の希釈系列は、取扱説明書で指定された数とする。

ｲ．試験用試料溶液の調製

試験用試料溶液の調製は、別途準備した分析対象物質及びその類似物質（１以上）の市販標準品の試料（標準試料）を用いて行うものとする。調製濃度は、製品の測定範囲内で段階的に希釈し設定する。但し、高い交差反応性を示す場合には調製濃度の再設定を行うものとする。また、類似物質は、既存環境調査結果事例等を参考に物質特性を勘案して設定するものとする。

なお、希釈する溶媒は、取扱説明書で指定された溶液（製品に添付された緩衝液等）を用いるものとする。

ここで準備する試験用試料溶液の種類数は、検量線作成用標準溶液の希釈系列として取扱説明書で指定された数と同数とする。

ｳ．製品の操作

実証対象製品について、実証対象製品について、検量線作成用標準溶液を用いた測定（取扱説明書で指定された回数）とあわせて、各調製濃度（既知）の試験用試料溶液を用いた測定（３重測定以上）を行うものとする。

なお、製品の操作は、取扱説明書に基づいて行うものとする。

ｴ．吸光度の測定

発色反応後、各試験用試料溶液の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定し、その平均値を各試験用試料溶液の吸光度とする。

ｵ．検量線の作成

製品の取扱説明書に基づき、検量線作成用標準溶液を用いた各濃度での吸光度から検量線を作成する。

なお、検量線の作成にあたって市販解析ソフトを用いた場合は、そのソフト名を明記しておくものとする。

ｶ．実測濃度の算出

製品の取扱説明書に基づき、各試験用試料溶液による吸光度から検量線を用いて各濃度（実測濃度）を算出する。

ｷ．交差反応性の整理

物質別の試験用試料溶液について得られた 50%阻害濃度等を用いて、分析対象物質を基準とした時の類似物質別の交差率を整理する。

ｸ．考察

得られた交差率等から、実証対象製品の交差反応性の妥当性について考察する。

(2) 実用的な性能

実証対象製品の実用的な性能を検討するため、環境試料への適用性等の観点から環境試料試験を行うものとする。

実証項目別に行う実証試験の内容は、以下に示すとおりである。なお、実証機関は、技術実証委員会の承認の下で、実証項目の補足等による効果的な実証試験を実施することができるものとする。

① 回収特性

実証対象製品について、分析対象物質及びその類似物質の市販標準品で混合した試料（環境試料（模擬））を用いて調製した試験用試料溶液を測定し、製品の取扱説明書に基づく手法により作成した検量線を用いて試験用試料溶液の濃度（実測濃度）を算出する。

これより、試験用試料溶液の調製濃度と実証対象製品による実測濃度の比較等から、測定上の変動等について検討する。

なお、この試験で必要な実証対象製品のキット数は１である。

標準試料試験の手順は、以下のとおりとする。

ｱ. 検量線作成用標準溶液の調製

検量線作成用標準溶液の調製は、製品の取扱説明書に基づいた付属品等を用いて行うものとする。例えば、製品に添付された標準品の原液を、取扱説明書で指定された溶液（製品に添付された緩衝液等）で段階的に希釈し、検量線作成のための標準溶液の希釈系列を調製するなどである。

ここで準備する検量線作成用標準溶液の希釈系列は、取扱説明書で指定された数とする。

ｲ. 試験用試料溶液の調製

試験用試料溶液の調製は、別途準備した分析対象物質及びその類似物質の市販標準品を混合した試料（環境試料（模擬））を用いて行うものとする。調製濃度は、製品の測定範囲内の中央付近で設定する。また、類似物質は、既存環境調査結果事例等を参考に物質特性などを勘案して設定するものとする。

なお、希釈する溶媒は、取扱説明書で指定された溶液（製品に添付された緩衝液等）を用いるものとする。

ｳ．製品の操作

実証対象製品について、検量線作成用標準溶液を用いた測定（取扱説明書で指定された回数）とあわせて、同時に各調製濃度（既知）の試験用試料溶液を用いた測定（３重測定以上）を行うものとする。

なお、製品の操作は、取扱説明書に基づいて行うものとする。

ｴ．吸光度の測定

発色反応後、各試験用試料溶液の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定し、その平均値を各試験用試料溶液の吸光度とする。

ｵ．検量線の作成

製品の取扱説明書に基づき、検量線作成用標準溶液を用いた各濃度での吸光度から検量線を作成する。

なお、検量線の作成にあたって市販解析ソフトを用いた場合は、そのソフト名を明記しておくものとする。

ｶ．実測濃度の算出

製品の取扱説明書に基づき、各試験用試料溶液による吸光度から検量線を用いて各濃度（実測濃度）を算出する。

ｷ．回収特性の整理

試験用試料溶液について得られた実測濃度を用いて、分析対象物質の調製濃度と比較し整理する。

ｸ．考察

得られた濃度の比較から、実証対象製品の回収特性の妥当性について考察する。

② 測定精度等

実証対象製品について、環境媒体中から採取した試料（河川水等）を用いて分析対象物質を測定し、製品の取扱説明書に基づく手法により作成した検量線を用いて試験用試料溶液の濃度（実測濃度）を算出する。

測定は、環境技術開発者の製品仕様に記載している前処理手法、機器分析で通常採用する前処理手法の２つを用いてクリンアップした試料を用いるものとする。

なお、この試験で必要な実証対象製品のキット数は１である。

環境試料試験の手順は、以下のとおりとする。

ｱ. 検量線作成用標準溶液の調製

検量線作成用標準溶液の調製は、製品の取扱説明書に基づいた付属品等を用いて行うものとする。例えば、製品に添付された標準品の原液を、取扱説明書で指定された溶液（製品に添付された緩衝液等）で段階的に希釈し、検量線作成のための標準溶液の希釈系列を調製するなどである。

ここで準備する検量線作成用標準溶液の希釈系列は、取扱説明書で指定された数とする。

ｲ. 試験用試料溶液の調製

(ｱ) 環境試料の準備

環境試料は、汚濁特性を勘案して含有物質の量や質の相違が想定される地点（河川等）で、環境媒体中から環境省等で定める所定のサンプリング方法により採取する。

例えば、河川水の場合、既存環境調査結果等を参考としながら分析対象物質の濃度が異なると推定される複数地点を設定したり、河川へ流入する発生源（生活排水（有機系)、産業排水（無機系)、農業排水（農薬系）等）の汚濁特性から複数地点を設定したりすること等があげられる。

(ｲ) 環境試料の前処理

環境試料の前処理は、次の２ケースとする。

- ケース１：環境開発技術者が呈示（推奨）する前処理を行ったもの
- ケース２：機器分析で通常採用する前処理を行ったもの

(ｳ) 試験用試料溶液の調製

試験用試料溶液は、先の前処理を行った各ケースのものとする。

なお、希釈する溶媒は、取扱説明書で指定された溶液（製品に添付された緩衝液等）を用いるものとする。

また、必要に応じて、分析対象物質の市販標準品を添加した試料の調製を行うことを検討するものとする。

ｳ. 製品の操作

実証対象製品について、検量線作成用標準溶液を用いた測定（取扱説明書で指定された回数）とあわせて、同時に試験用試料溶液（ケース１）を用いた測定（３重測定以上）を行うものとする。

なお、製品の操作は、取扱説明書に基づいて行うものとする。

参考として、試験用試料溶液（ケース２）の機器分析を行うものとする。

ｴ．吸光度の測定

発色反応後、各試験用試料溶液の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定し、その平均値を各試験用試料溶液の吸光度とする。

ｵ．検量線の作成

製品の取扱説明書に基づき、検量線作成用標準溶液を用いた各濃度での吸光度から検量線を作成する。

なお、検量線の作成にあたって市販解析ソフトを用いた場合は、そのソフト名を明記しておくものとする。

ｶ．実測濃度の算出

製品の取扱説明書に基づき、各試験用試料溶液による吸光度から検量線を用いて各濃度（実測濃度）を算出する。また、機器分析を用いた試験用試料溶液の実測濃度も算出する。

ｷ．測定精度等の整理

試験用試料溶液について得られた実測濃度を用いて、機器分析による実測濃度と比較し整理する。

ｸ．考察

得られた濃度の比較や全体的な製品の操作状況などから、下記の事項について実証対象製品の信頼性、実用性、簡便性等の観点から考察する。

- 機器分析値との差による測定精度（濃度）
- 試料の汚濁特性に応じた前処理妥当性（夾雑物質影響）
- 全過程を通じた操作簡便性（時間、操作数）
- 測定結果による環境試料への適用可能性など

(3) まとめ

実証項目別に想定される実証試験の概要をまとめたものを次表に示す。

表 5　実証項目別に想定される実証試験の概要（1/3）

実証項目/試験内容			1．基本的な性能			
			①測定範囲	②検出下限及び定量下限	③繰返し再現性	④日間再現性
標準試料試験	検量線作成用標準溶液	試薬	添付された標準品			
		希釈* 系列数	取扱説明書で指定された数			
	試験用試料溶液	試薬	標準試料 （市販標準品単一）			
		物質[A]	分析対象物質（１）			
		希釈 溶媒	取扱説明書で指定された溶液			
		濃度 調製	測定範囲内で段階的に希釈設定	測定範囲下限付近に希釈設定	測定範囲内の直線域に希釈設定	測定範囲内で段階的に希釈設定
		溶液数[B]	複数 (*と同数)	1	1	複数 (*と同数)
	製品の操作	時間	同時	同時	同時	別々
		対象	同プレート内	同プレート内	同プレート内	同ロット 異プレート間
		必要[C] キット数	1	1	1	3
	吸光度の測定		平均値 （３重測定以上）	個別測定値		平均値 （３重測定以上）
	検量線の作成		検量線作成用標準溶液を用いた各濃度での 吸光度から作成			
	機器分析の実施		-	-	-	-
	ＥＬＩＳＡ法による実測濃度の算出・整理	算出数	*と同数	測定回数と同数	測定回数と同数	*と同数
		指標	標準偏差 変動係数	標準偏差	標準偏差 変動係数	標準偏差 変動係数
	考察		測定範囲の妥当性	検出下限及び定量下限の妥当性	繰返し再現性の妥当性	日間再現性の妥当性

注：実測濃度の個数はA×B×C
　　同プレートを用いて、複数の実証項目を同時に併行実施することも可能（①④⑥）

表 6　実証項目別に想定される実証試験の概要（2/3）

実証項目/試験内容			1．基本的な性能		
			⑤期間再現性	⑥プレート間再現性	⑦交差反応性
標準試料試験	検量線作成用 標準溶液	試薬	添付された標準品		
		希釈* 系列数	取扱説明書で指定された数		
	試験用 試料溶液	試薬	標準試料 （市販標準品単一）		標準試料 （市販標準品複数）
		物質[A]	分析対象物質（１）		分析対象物質（１） 類似物質（１以上）
		希釈 溶媒	取扱説明書で指定された溶液		
		濃度 調製	測定範囲内で段階的に希釈設定	測定範囲内で段階的に希釈設定	測定範囲中央付近に希釈設定
		溶液数[B]	複数 （*と同数）	複数 （*と同数）	複数 （物質数と同数）
	製品の操作	時間	同時	同時	同時
		対象	同プレート内	同ロット異プレート間 異ロット異プレート間	同プレート内
		必要[C] キット数	1	3	1
	吸光度の測定		平均値 （３重測定以上）		
	検量線の作成		検量線作成用標準溶液を用いた各濃度での 吸光度から作成		
	機器分析の実施		-	-	-
	ＥＬＩＳＡ法による 実測濃度の 算出・整理	算出数	*と同数	*と同数	物質数と同数
		指標	標準偏差 変動係数	標準偏差 変動係数	交差率
	考察		期間再現性の 妥当性	プレート間再現性の 妥当性	交差反応性の 妥当性

注：実測濃度の個数は A×B×C
　　同プレートを用いて、複数の実証項目を同時に併行実施することも可能（①④⑥）

表 7　実証項目別に想定される実証試験の概要（3/3）

<table>
<tr><th colspan="3" rowspan="2">実証項目/試験内容</th><th colspan="2">2．実用的な性能</th></tr>
<tr><th>①回収特性</th><th>②測定精度等</th></tr>
<tr><td rowspan="16">環境試料試験</td><td rowspan="2">検量線作成用
標準溶液</td><td>試薬</td><td colspan="2">添付された標準品</td></tr>
<tr><td>希釈*
系列数</td><td colspan="2">取扱説明書で指定された数</td></tr>
<tr><td rowspan="5">試験用
試料溶液</td><td>試薬</td><td>環境試料（模擬）
（市販標準品複数）</td><td>環境試料</td></tr>
<tr><td>物質[A]</td><td>分析対象物質（1）と類似物質
（1以上）を混合</td><td>試料特性等に応じた
物質</td></tr>
<tr><td>希釈
溶媒</td><td colspan="2">取扱説明書で指定された溶液</td></tr>
<tr><td>濃度
調製</td><td>実環境を想定した
市販標準品を混合調製</td><td>実試料</td></tr>
<tr><td>溶液数[B]</td><td>1以上</td><td>複数
（試料と同数）</td></tr>
<tr><td rowspan="3">製品の操作</td><td>時間</td><td>同時</td><td>同時</td></tr>
<tr><td>対象</td><td>同プレート内</td><td>同プレート内</td></tr>
<tr><td>必要[C]
キット数</td><td>1</td><td>1</td></tr>
<tr><td colspan="2">吸光度の測定</td><td colspan="2">平均値
（３重測定以上）</td></tr>
<tr><td colspan="2">検量線の作成</td><td colspan="2">検量線作成用標準溶液を用いた各濃度での
吸光度から作成</td></tr>
<tr><td colspan="2">機器分析の実施</td><td>-</td><td>併行実施</td></tr>
<tr><td rowspan="2">ＥＬＩＳＡ法による
実測濃度の
算出・整理</td><td>算出数</td><td>1以上</td><td>試料数と同数</td></tr>
<tr><td>指標</td><td>調製濃度との比較等</td><td>機器分析との比較
全体操作等</td></tr>
<tr><td colspan="2">考察</td><td>回収特性の妥当性</td><td>測定精度、前処理妥当性、
操作簡便性等</td></tr>
</table>

注：実測濃度の個数はA×B×C